Aus dem Physiologisch-chemischen Institut
der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr.Dr. Ernst Schütte

ZUM PHOSPHATSTOFFWECHSEL IN MENSCHLICHEN ERYTHROZYTEN UND ZU SEINER BEEINFLUSSUNG DURCH THIAMIN

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Werner Winkelmann
aus Bremen

1961

Druck:

Ernst - Reuter - Gesellschaft
der Förderer und Freunde der Freien Universität Berlin e.V.

Dissertations-Druckstelle

Berlin - Dahlem, Garystraße 45, Tel.: 76 52 61, App. 668

Aus dem Physiologisch-chemischen Institut
der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr.Dr. Ernst Schütte

ZUM PHOSPHATSTOFFWECHSEL IN MENSCHLICHEN ERYTHROZYTEN UND ZU SEINER BEEINFLUSSUNG DURCH THIAMIN

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Werner Winkelmann
aus Bremen

Dekan: Professor Dr. Helmut Selbach
Referent: Professor Dr. Dr. Ernst Schütte
Korreferent: Professor Dr. Hans Herken

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 9. März 1961

Inhaltsübersicht

I. Einleitung

II. Theoretischer Teil
1. Glykolyseschema in kernlosen Erythrozyten
2. Einbau von $^{32}PO_4'''$ in die Phosphatfraktionen des Erythrozyten
3. Phosphatresorption durch kernlose rote Blutzellen
4. Pentosephosphat-shunt in Erythrozyten
5. Funktion des Thiamins im Stoffwechsel
6. Biosynthese der Thiaminphosphorsäureester
7. Thiamin im Stoffwechsel der Blutzellen

III. Problemstellung

IV. Eigene Untersuchungen

A. Methodik

B. Ergebnisse und Diskussion
1. Resorption von ^{32}P-Orthophosphat durch menschliche Erythrozyten unter physiologischen Bedingungen und in Gegenwart von Thiamin
2. Verteilung der $^{32}PO_4'''$-markierten säurelöslichen Phosphatester in Erythrozyten und Hämolysat mit und ohne Thiaminzusatz
3. Einfluß von 2,4-Dinitrophenol und Arsenat auf den Phosphatstoffwechsel in menschlichen Erythrozyten
4. Resorption von Thiamin in menschlichen Erythrozyten
5. Biosynthese von Thiaminphosphorsäureestern in menschlichem Vollblut

6. Inkubation von ^{32}P-markierten Thiaminphosphorsäureestern mit Vollblut, Hämolysat und Plasma

C. Zusammenfassung

D. Experimenteller Teil

V. Literaturverzeichnis

I. Einleitung

O. WARBURG zeigte 1909, daß in reifen menschlichen Erythrozyten eine meßbare Sauerstoffatmung nicht mit Sicherheit nachzuweisen ist (1). MACLEOD (2), sowie HARROP und BARRON (3) fanden, daß in kernlosen roten Blutzellen die Glykolyse abläuft. Diese ist für den menschlichen Erythrozyten die entscheidende Energiequelle, denn ein vollständiger Zitronensäurezyklus und die Atmungskette mit der Möglichkeit zur stufenweisen Bildung energiereicher Phosphatbindungen fehlen (4). BARRENSCHEEN und Mitarbeiter bewiesen zuerst, daß der normale Gehalt an ATP und anderen Phosphatestern im Blut aus der Glykolyse stammt (5). DISCHE fand, daß Glucose in Erythrozyten nur in Gegenwart von ATP phosphoryliert wird, und daß Fruktosediphosphat und Triosephosphate als Zwischenprodukte der Glykolyse vorliegen (6). Nach ROCHE und ROCHE (7) ist Fruktosediphosphat im Hämolysat weitaus stoffwechselaktiver als unveresterte Glucose. SCHUCHARDT und VERCELLONE (8), sowie BRAUNSTEIN (9) wiesen nach, daß Monophosphoglycerinsäure im Hämolysat schnell abgebaut wird und zur Bildung von Brenztraubensäure und Phosphoenolbrenztraubensäure führt. 2,3-Diphosphoglycerinsäure erwies sich in ihren Versuchen als sehr stabil; sie wurde im Hämolysat nicht verändert. RAPOPORT und GUEST (10) beobachteten jedoch einen Abbau dieser Substanz durch intakte rote Blutzellen in vitro.

Der menschliche Erythrozyt beschreitet mit der Bildung größerer Mengen von 2,3-Diphosphoglycerinsäure, die nach GREENWALD über 50 % des intrazellulären säurelöslichen Phosphats ausmacht (11), einen gegenüber anderen Körperzellen veränderten Weg der Glykolyse. JOST vermutete schon 1927 (12), daß die 2,3-Diphosphoglycerinsäure innerhalb der Glykolyse der roten Blutzellen eine bedeutende Stellung einnimmt, aber er hatte weder experimentelle Befunde, noch genauere Vorstellungen darüber. Die weitgehende Aufklärung der Biosynthese und des Abbaus der 2,3-Diphosphoglycerinsäure in kernlosen Erythrozyten gelang RAPOPORT und Mitarbeitern (13, 14, 15, 16).

Mit Hilfe des optischen Tests bestimmten LÖHR und WALLER (17, 18) in menschlichen Erythrozyten den Gehalt an Fermenten der Glykolyse. Sie konnten Aldolase, Trioseisomerase, Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase, Phosphoglycerat-Kinase und Milchsäuredehydrogenase nachweisen. Der Anteil der Fermente am Gesamtprotein liegt in der Muskulatur vergleichsweise bis zu zwei Größenordnungen höher. In diesem Ergebnis wird ein Beweis dafür gesehen, daß in der roten Blutzelle vorwiegend ein Selbsterhaltungsstoffwechsel abläuft.

II. Theoretischer Teil

1. Glykolyseschema in kernlosen Erythrozyten

Die organischen säurelöslichen Phosphatester des Blutes sind vorwiegend auf die Zellen beschränkt (19). Die Glykolyse, in deren Verlauf sie synsthetisiert werden, läuft in kernlosen Erythrozyten nach einem Schema ab, das sich - wie schon eingangs erwähnt, - durch die Bildung von 2,3DPGS*) wesentlich von dem in anderen Gewebszellen unterscheidet. Aus der Phosphoglyceratmutasereaktion, durch die 3-Phosphoglycerinsäure in 2-Phosphoglycerinsäure überführt wird und an der die 2,3DPGS als Katalysator beteiligt ist (20), wird jedoch ersichtlich, daß diese Substanz nicht auf Erythrozyten beschränkt ist, sondern auch in anderen Geweben vorliegen muß. Aber in roten Blutzellen ist der Gehalt an 2,3DPGS mit mehr als 50 % des gesamten säu-

---

*) Es wurden in der Arbeit folgende Abkürzungen gebraucht:

2,3 DPGS = 2,3-Diphosphoglycerinsäure
1,3 PGS = 1,3-Diphosphoglycerinsäure
3 PGS = 3-Phosphoglycerinsäure
T = Thiamin
TMP = Thiaminmonophosphat
TDP = Thiamindiphosphat
TTP = Thiamintriphosphat

relöslichen Phosphats (11) höher als in anderen Geweben. HEVESY und Mitarbeiter (21, 22) inkubierten erstmals kernlose Erythrozyten mit $^{32}PO_4^{'''}$. In ihren Versuchen zeigte die 2,3DPGS einen hohen ^{32}P-Einbau, und es wurde daraus geschlossen, daß die Substanz entweder im Hauptweg der Glykolyse liegt oder aber sich in einem Gleichgewichtszustand mit einem Intermediärprodukt befindet (19).

RAPOPORT und LUEBERING (13) wiesen eine fermentative Umwandlung der 1,3PGS zu 2,3DPGS durch ein spezifisches Enzym, die Diphosphoglyceromutase, nach. Diese Fermentreaktion scheint weitgehend irreversibel nur in Richtung der 2,3DPGS abzulaufen.

In einer weiteren Arbeit untersuchten die gleichen Autoren den fermentativen Abbau der 2,3DPGS (14). Im Muskel und in Erythrozyten wurde ein Enzym nachgewiesen, das die 2,3DPGS in 3PGS umwandelt, die Glycerat-2,3-Diphosphatase.

Die 3PGS kann im weiteren Verlauf der Glykolyse in Phosphoenolbrenztraubensäure umgewandelt werden, die einen energiereichen Phosphatrest auf das ADP überträgt und dadurch ATP bildet. Demnach würde pro Mol 2,3DPGS ein Mol ATP entstehen (15). PRANKERD und ALTMAN (23) diskutierten die Bildung von 2 Mol ATP unter Annahme einer rückläufigen Diphosphoglyceromutasereaktion. Gegen eine solche Hypothese sprechen neben den Ergebnissen von RAPOPORT (13) auch energetische Überlegungen.

Aus den Befunden wird jedoch ersichtlich, daß in glykolysierenden Erythrozyten folgende Reaktionen nacheinander ablaufen können:

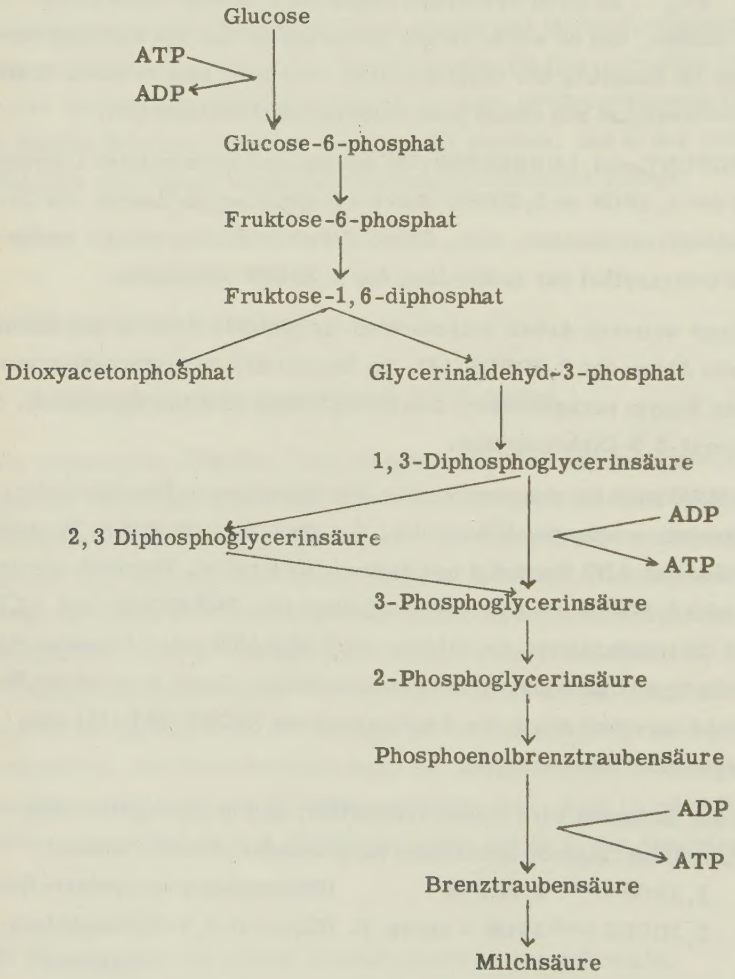
(1) 1,3PGS $\rightleftharpoons$ 2,3DPGS (Diphosphoglyceromutase-Reakt.)

(2) 2,3DPGS $\rightleftharpoons$ 3PGS + anorg. P. (Glycerat-2,3-Diphosphatase-Reaktion)

In anderen Körperzellen wird die 1,3PGS vorwiegend durch die Phosphoglyceratkinase direkt zur 3-PGS abgebaut, wobei eine energiereiche Phosphatbindung gebildet wird:

(3) 1,3PGS + ADP $\rightleftharpoons$ 3PGS + ATP

SCHEMA DER GLYKOLYSE IN ERYTHROZYTEN



RAPOPORT bestimmte in Erythrozyten den Anteil der 3PGS an den gesamten Phosphoglycerinsäuren unter normalen Stoffwechselbedingungen, sowie nach Zusatz von NaF (16). In beiden Fällen betrug die Konzentration an 3PGS nur 2,5 - 3,5 % der gesamten Phosphoglycerinsäuren.

BARTLETT et al. (24) inkubierten Erythrozyten mit ^{14}C-Glucose und fanden nach 4 Stunden etwa die Hälfte der Ausgangsaktivität in der Milchsäure wieder, die andere Hälfte dagegen in der Fraktion der unlöslichen Bariumsalze, welche vorwiegend ATP und 2,3DPGS enthält. Da die Kohlenstoffatome des ATP während der Inkubationsdauer nicht ausgetauscht werden, ist die Aktivität dieser Fraktion auf markierte 2,3DPGS zurückzuführen.

Über die Bedeutung und das Ausmaß der Einbeziehung der 2,3DPGS in die Glykolyse der Erythrozyten werden gegenwärtig noch unterschiedliche Meinungen vertreten.

RAPOPORT schloß aus den vorliegenden Befunden, daß in den kernlosen Erythrozyten die 2,3DPGS im Hauptweg der Glykolyse liegt (16). Die Phosphoglycerinsäuren sollen dabei in einem eingeschalteten PGS-Zyklus in enger wechselseitiger Beziehung zueinander stehen. - Die Existenz eines solchen PGS-Zyklus in Erythrozyten und auf Grund der Beteiligung der 2,3DPGS an der Phosphoglyceratmutasereaktion wohl auch in anderen Gewebszellen darf als sicher gelten. Es kann dagegen noch nicht entschieden werden, ob der 2,3DPGS innerhalb der Glykolyse kernloser roter Blutzellen wirklich die von RAPOPORT postulierte Bedeutung zukommt.

2. Einbau von $^{32}PO_4^{'''}$ in die Phosphatfraktionen des Erythrozyten

GERLACH et al. (25) untersuchten den Phosphatstoffwechsel in menschlichen Erythrozyten mit einem kombinierten papierchromatographisch-radiochemischen Verfahren. Nach Inkubation der Blutzellen mit $^{32}PO_4^{'''}$ wurden die Konzentrationen der säurelöslichen Phosphatfraktionen nach papierchromatographischer Trennung, sowie die Markie-

rung mit $^{32}PO_4'''$ bestimmt. Das Studium des ^{32}P-Einbaus in die einzelnen Phosphatester führte zu folgendem Ergebnis: Nach 15 und 30 Minuten zeigte das γ-P-Atom des ATP eine weitaus höhere Einbaurate als die 2,3DPGS. Die relativen Einbaugeschwindigkeiten des markierten Phosphats in das γ-P-Atom des ATP und in die 2,3DPGS verhielten sich nach 15 Minuten etwa wie 20 : 1, nach 60 Minuten dagegen wie 4,4 : 1.

Aus diesen Befunden wurde geschlossen, daß der von RAPOPORT (16) postulierte Weg der Glykolyse in menschlichen Erythrozyten nicht vorwiegend beschritten wird, sondern daß auch hier wie in anderen Gewebszellen in der Hauptsache die Phosphoglyceratkinase-Reaktion zur 3-PGS führt.

GOURLEY (26), sowie PRANKERD und ALTMAN (23) untersuchten ebenfalls die Resorption von $^{32}PO_4'''$ durch Erythrozyten und den Einbau in die Phosphatester.

GOURLEY inkubierte Erythrozyten 8 Stunden mit $^{32}PO_4'''$. Zu diesem Zeitpunkt war ein Gleichgewicht zwischen der ^{32}P-Aufnahme und -Abgabe erreicht. Innerhalb der ersten beiden Stunden war die relative spezifische Aktivität der labilen P-Atome des ATP höher als die aller anderen Phosphatfraktionen, während die 2,3DPGS nach etwa 6 Stunden die höchste relative spezifische Aktivität zeigte.

PRANKERD und ALTMAN (23) bestimmten nach Inkubation von Erythrozyten mit $^{32}PO_4'''$ im Verlaufe von 24 Stunden die relativen spezifischen Aktivitäten der Phosphatester. Unter ihren Versuchsbedingungen war die relative spezifische Aktivität der 2,3DPGS nach 9 Stunden höher als die des ATP.

3. Phosphatresorption durch kernlose rote Blutzellen

Die ^{32}P-Markierung der Phosphatester ist dadurch bedingt, daß das ^{32}P-Orthophosphat auf der Stufe des Triosephosphats in die Glykolyse gelangt, wie aus den folgenden Gleichungen ersichtlich wird:

$$\text{Phosphoglycerinaldehyd+DPN} + {}^{32}PO_4 \rightleftharpoons (1\text{-}{}^{32}P)1,3PGS + DPNH_2$$
$$(1\text{-}{}^{32}P)1,3PGS \rightleftharpoons (2\text{-}{}^{32}P)2,3DPGS$$

Dabei ergibt sich die Frage, ob das Phosphat aktiv in die Blutzelle transportiert wird oder ob ein reiner Diffusionsvorgang vorliegt.

PRANKERD und ALTMAN (23) fanden nach Inkubation von Erythrozyten mit ${}^{32}PO_4'''$ einen geradlinigen Abfall der Aktivität im Plasma, der stark temperaturabhängig war. Eine Hemmung der Resorption von markiertem Orthophosphat trat außer durch niedrige Temperaturen auch durch Zusatz von Monojodessigsäure, NaF und Arsenat auf. Während bei Glucoseverarmung der Erythrozyten nur wenig Orthophosphat in die Zellen gelangte, erhöhte sich dieser Prozentsatz signifikant nach Zusatz von Adenosin zu den glucoseverarmten Erythrozyten.

Aus diesen Befunden wird ersichtlich, daß bei der Resorption von Orthophosphat in die Zellen eine Abhängigkeit von energieliefernden Reaktionen der Glykolyse besteht. GERLACH et al. (25) diskutierten die Tatsache als einen wichtigen Beweis für einen aktiven Transport des Phosphats in die Blutzellen, daß der ${}^{32}P$-Einbau in das intrazelluläre Orthophosphat nach 15, 30 und 60 Minuten geringer ist als der in das ATP.

Das Vorliegen eines Mechanismus des aktiven Transports von Phosphat in die Erythrozyten kann demnach nicht mehr bezweifelt werden. Die genaueren Einzelheiten sind dagegen noch nicht restlos aufgeklärt.

4. Pentosephosphat-shunt in Erythrozyten

Nach den Untersuchungen von DISCHE (27) und BRUNS (28) ist der menschliche Erythrozyt auch zum oxydativen Abbau des Glucose-6-phosphats über den Pentosephosphat-shunt nach HORECKER (29) und DICKENS (30) befähigt.

DISCHE fand im Hämolysat eine Umwandlung von zugefügtem Ribose-5-phosphat in die Hexose-6-phosphate und in Fruktose-1,6-diphosphat. BRUNS setzte ebenfalls menschlichem Hämolysat Ribose-5-phosphat hinzu und stellte fest, daß 25 % davon schon nach 30 Minuten in Keto-

pentosephosphat umgewandelt waren. Nach einer Inkubationsdauer von 2-3 Stunden ließen sich Glucose-6-phosphat und Fruktose-6-phosphat nachweisen.

WALLER und LÖHR (18) bestimmten den Gehalt menschlicher Erythrozyten an Glucose-6-phosphatdehydrogenase und fanden, daß bei einem Patienten mit gesteigerter Hämolyse dieses Ferment in den roten Blutzellen gänzlich fehlte. Der ATP-Gehalt der roten Blutzellen war in diesem Fall völlig normal.

Menschliche Erythrozyten zeigen nach Zusatz von Methylenblau einen gesteigerten Sauerstoffverbrauch (31, 32). BRIN und YONEMOTO (33) untersuchten dieses Phänomen mit Hilfe von Isotopen. Sie inkubierten menschliche Erythrozyten mit Methylenblau und ^{14}C-markierter Glucose und fanden eine direkte Abhängigkeit zwischen dem Sauerstoffverbrauch und der Bildung von $^{14}CO_2$ aus Glucose-1-^{14}C und Glucose-2-^{14}C einerseits und der Konzentration des zugesetzten Farbstoffes andererseits. Aus Glucose-6-^{14}C wurde kein markiertes CO_2 gebildet. Die spezifische Aktivität der entstandenen Milchsäure war in Gegenwart von Methylenblau um 50 % geringer als bei Fehlen dieses Farbstoffes. Die Autoren sehen in der Wirkung des Methylenblaus die eines "Zünders" für den oxydativen Abbau der Glucose über den Pentosephosphat-shunt.

Aus diesen Ergebnissen wird ersichtlich, daß im menschlichen Erythrozyten sämtliche Fermente des Pentosephosphat-shunts enthalten sind. Einige von ihnen, wie insbesondere die Phosphoriboseisomerase, weisen im Hämolysat Aktivitäten auf, die durchaus denen der Glykolyseenzyme gleichkommen (28).

Nach den Befunden von WALLER und LÖHR (18) scheint jedoch der Pentosephosphat-shunt quantitativ für die Energiebilanz des menschlichen Erythrozyten kaum eine wesentliche Rolle zu spielen. Eine mögliche Aufgabe im Stoffwechsel ist vielleicht darin zu sehen, daß auf diesem Wege Pentosephosphat für die Nucleotidsynthese bereitgestellt wird (28). Außerdem ist das hydrierte TPN, das beim oxydativen Ab-

bau der Glucose entsteht, von Bedeutung für die Reduktion des Hämiglobins, auch wenn diese vorwiegend durch das hydrierte DPN bewirkt wird, das im Rahmen der Glykolyse gebildet wird (34).

5. Funktion des Thiamins im Stoffwechsel

Schon sehr früh erkannte man die enge Beziehung des Thiamins, dessen Bedeutung als Vitamin erstmals von FUNK (35) beschrieben wurde, zum Phosphatstoffwechsel. NEUBERG entdeckte die Hefecarboxylase (36), die Brenztraubensäure unter Abspaltung von CO_2 in Acetaldehyd umwandelt. Durch Waschen mit alkalischem Phosphatpuffer verlor dieses Ferment seine Aktivität, die sich durch Zusatz eines zunächst unbekannten hitzestabilen Co-Faktors aus der Hefe nahezu vollständig wiederherstellen ließ (37).

Die Isolierung und Aufklärung dieses Co-Fermentes als Thiaminpyrophosphat gelang LOHMANN und SCHUSTER (38).

Die Verbindung ist als Co-Ferment - teilweise zusammen mit der α-Liponsäure - noch an anderen Reaktionen beteiligt:

Reaktion	Ferment
Brenztraubensäure + CoA + DPN $\rightleftharpoons$ Acetyl-CoA + $DPNH_2$ + CO_2	Brenztraubensäureoxydase
α-Ketoglutarsäure + CoA + DPN $\rightleftharpoons$ Succinyl-CoA + $DPNH_2$ + CO_2	α-Ketoglutarsäure-dehydrogenase
Ribulose-5-P + Ribose-5-P $\rightleftharpoons$ Sedoheptul-7-P + Triose-3-P	Transketolase
Brenztraubensäure $\rightleftharpoons$ Acetaldehyd + CO_2	Carboxylase

Tab. 1: Fermentreaktionen, die unter Beteiligung von TDP als Co-Ferment ablaufen.

Dem Thiaminmonophosphat kommt offenbar keine Co-Fermentfunktion zu (39). Entgegen früheren Befunden von SILIPRANDI und SILIPRANDI (40) vermag auch das Thiamintriphosphat nach Angaben von ROSSI-

FANELLI (41) und KIESSLING (39) die Cocarboxylase nicht zu ersetzen.

Nach den bisherigen Ergebnissen ist es noch fraglich, ob das freie Thiamin im Stoffwechsel eine spezielle Funktion hat oder ob es nur als Ausgangssubstanz für die Phosphorylierung zum aktiven TDP gespeichert wird.

WOLLEY und MERRIFIELD (42) fanden nach Verfütterung des Antivitamins Neopyrithiamin bei ihren Versuchstieren insbesondere neurologische Ausfallserscheinungen. Der Cocarboxylase und Brenztraubensäuregehalt in den verschiedenen Geweben wurde jedoch als normal angegeben. Daraus schlossen die Autoren auf eine spezielle, noch unbekannte Funktion des freien Thiamins im Stoffwechsel, bei deren Ausfall vor allem die neurologischen Symptome auftreten sollten. Die experimentellen Befunde konnten jedoch von STEYN-PARVE et al. (43) nicht bestätigt werden. Bei Auftreten von Mangelsymptomen nach Pyrithiamingaben an Ratten wiesen alle untersuchten Gewebe einen signifikant verminderten Gehalt an TDP auf.

In der Hefe wurde eine Aktivierung der Carboxylase durch freies Thiamin festgestellt (44, 45). Dieser Effekt ist vermutlich mit der Hemmung der Hefephosphatasen durch Thiamin zu erklären (39). Die Carboxylase in tierischen Geweben wird nach WESTENBRINK (46) in ihrer Aktivität durch freies Thiamin nicht beeinflußt.

6. Biosynthese der Thiaminphosphorsäureester

Schon LOHMANN und SCHUSTER (38) zeigten, daß in Extrakten aus Taubengehirn eine Synthese der Cocarboxylase aus Thiamin stattfindet. ATP, Kreatinphosphat und Phosphoenolbrenztraubensäure beschleunigten die Reaktion. LIPTON und ELVEHJEM untersuchten den Phosphorylierungsmechanismus in der Bierhefe und schlugen folgende Reaktion vor (47):

$$\text{ATP} + \text{Thiamin} \rightleftharpoons \text{TDP} + \text{AMP}$$

STEYN-PARVE (48) isolierte das entsprechende Ferment, die Thiaminokinase, aus Bäckerhefe und fand eine Phosphorylierung sowohl von Thiamin als auch von TMP zu TDP. Ausgehend von TMP war die Ausbeute an Cocarboxylase jedoch um 50 % geringer. Ein primärer Abbau des TMP zu Thiamin mit sekundärer Phosphorylierung zum TDP ließ sich ausschließen, da das Thiaminokinasepräparat phosphatasefrei war. Mit einem Enzym, das aus Rattenleber isoliert wurde, gelang auch LEUTHARDT und NIELSEN (49) die Synthese von TDP aus Thiamin und ATP.

FORSANDER (50) studierte die Phosphorylierung des Thiamins mit einer aus Bäckerhefe gewonnenen Thiaminokinase unter Zusatz von γ-P-markiertem ATP als Donator. Er konnte nachweisen, daß ein ganzer Pyrophosphatrest auf das Thiamin übertragen wird.

Aber die zitierten Befunde (48) machten es wahrscheinlich, daß nach einem anderen Mechanismus auch die Phosphorylierung von TMP zu TDP möglich ist. Den Nachweis dafür erbrachte KIESSLING (39).

GREILING (51) reicherte aus Bierhefe ein Ferment an, welches Thiamin in Gegenwart von ATP zu TMP phosphoryliert.

Aus zugesetztem Thiamin kann die Hefezelle auch TTP synthetisieren (51), das schon unter physiologischen Bedingungen in geringer Menge neben TDP und TMP vorhanden ist (52). KIESSLING untersuchte den Einbau von $^{32}PO_4'''$ in die Thiaminphosphorsäureester der Hefe (53) und fand, daß die Markierung im TTP mit größerer Geschwindigkeit erfolgte als in TDP und TMP. Die ^{32}P-Aktivität des TTP erreichte etwa die Hälfte der des ATP. Auf Grund dieser Befunde wurde eine mögliche Funktion des TTP beim Phosphattransport diskutiert.

7. Thiamin im Stoffwechsel der Blutzellen

Menschliche Erythrozyten enthalten Thiamin in größerer Konzentration als das umgebende Plasma (54). ZUZUOKI-ZIRO versuchte, die Resorption in roten Blutzellen zu studieren, konnte aber mit seiner Methodik keinen signifikanten Abfall der zugesetzten Thiaminkonzentra-

tionen im Plasma nachweisen (55).

In Hühnererythrozyten fanden SMITS und FLORIJN (54) über 70 % des gesamten TDP in den Kernen. Leukozyten enthalten etwa 160 mal soviel TDP wie kernlose Erythrozyten (56).

WESTENBRINK und STEYN-PARVE (57) untersuchten die Synthese von TDP aus zugesetztem Thiamin im Blut verschiedener Säugetiere. Optimale Werte ergaben sich nach 4-stündiger Inkubation von 1 ml Vollblut mit 1 mg Thiamin bei 37^{o} C.

SMITS und FLORIJN (56) studierten die Synthese von TDP in kernlosen Erythrozyten und Leukozyten getrennt. Eine Glucosekonzentration von 100 mg% erwies sich in ihren Versuchen als optimal. Durch Zusätze von Oxalat, Monojodacetat und Fluorid konnten sie die Synthese von TDP in Erythrozyten, durch Zusatz von Cyanid die in Leukozyten hemmen. Danach stammt die Syntheseenergie einmal aus der Glykolyse, zum anderen dagegen vorwiegend aus der Atmung. Das TDP wurde in den zitierten Versuchen manometrisch nach WESTENBRINK (58) bestimmt.

BRIN et al. (59) fanden in den Erythrozyten von Ratten, die mit einer Thiaminmangeldiät gefüttert worden waren, signifikante Unterschiede gegenüber den Kontrolltieren. Wurden die Erythrozyten der vorbehandelten Ratten mit Methylenblau inkubiert, so stauten sich Pentosephosphate an. Der Sauerstoffverbrauch war erniedrigt, und aus zugesetzter Glucose-2-^{14}C entstand gegenüber der Norm nur knapp 50 % markiertes CO_2. Diese Befunde waren durch Zusatz von Thiamin zu den Erythrozyten in vitro weitgehend zu normalisieren. Es wurde eine verminderte Transketolaseaktivität in den roten Blutzellen infolge eines reduzierten TDP-Gehaltes diskutiert.

Da in kernlosen Erythrozyten der Zitronensäurezyklus nicht ablaufen kann, ist wahrscheinlich das TDP hier vorwiegend als Co-Ferment der Transketolasereaktion von Bedeutung. Der Gehalt kernhaltiger Erythrozyten und Leukozyten an TDP ist höher, da beide Zellgruppen über die Fermente des KREBS-Zyklus verfügen, so daß das TDP weitere Co-Fermentfunktionen zu erfüllen hat.

III. Problemstellung

Die Beziehungen zwischen dem Phosphatstoffwechsel und dem Thiaminstoffwechsel sind bisher weitgehend ungeklärt.

Für die vorliegenden Untersuchungen wurden Erythrozyten gewählt, weil sie ein isoliertes tierisches Zellsystem mit eigenem Stoffwechsel darstellen.

An menschlichen roten Blutzellen wurde eine mögliche Wirkung des Thiamins auf den Phosphatstoffwechsel unter verschiedenen Gesichtspunkten studiert:

Zunächst ergab sich die Frage, ob die Phosphatresorption in Erythrozyten durch Thiamin zu beeinflussen ist.

Es wurde eine Methode ausgearbeitet, die es ermöglicht, mit Hilfe von $^{32}PO_4^{'''}$ die Phosphataufnahme durch rote Blutzellen unter physiologischen Bedingungen zu bestimmen.

Weiterhin interessierte es, ob nach Inkubation von Blutzellen mit $^{32}PO_4^{'''}$ in Gegenwart von Thiamin der ^{32}P-Einbau in die einzelnen Phosphatester des Erythrozyten verändert wird.

Es gelang, die ^{32}P-markierten Ester mit einem eindimensionalen papierchromatographischen Verfahren zu trennen. Mit dieser Methode konnte auch der zeitliche Verlauf des $^{32}PO_4^{'''}$-turnover radiometrisch verfolgt werden.

Nachdem experimentell von mir bewiesen war, daß das Thiamin die Phosphatresorption und den Phosphatstoffwechsel in Erythrozyten beeinflußt, galt es, den Mechanismus der Thiaminresorption durch rote Blutzellen näher zu studieren. ZUZUOKI-ZIRO (54) hatte bisher vergeblich versucht, dieses Problem aufzuklären. Es mußte eine neue fluorometrische Methode ausgearbeitet werden, welche die quantitative Bestimmung auch kleinster Thiaminmengen innerhalb der Erythrozyten ermöglicht.

Das Thiamin wird nach den vorliegenden Ergebnissen aktiv in die roten Blutzellen transportiert, so daß sich in diesem Zusammenhang die Frage ergab, ob das Vitamin in der Zellmembran oder innerhalb der Erythrozyten selbst fermentativ verändert wird. Da ^{35}S-Thiamin *) zur Verfügung stand, konnten auch geringe Veränderungen radiochemisch quantitativ erfaßt werden. Dieses war bisher noch nicht gelungen, weil eine entsprechende Methode fehlte.

Nach Inkubation von Vollblut mit ^{35}S-Thiamin wurden sowohl in den Erythrozyten als auch im Plasma Thiaminphosphorsäureester nachgewiesen. Deshalb wurde im folgenden untersucht, ob diese die Erythrozytenmembran durchdringen können. Außerdem lagen bisher noch keine Ergebnisse über den Abbau von Thiaminphosphorsäureestern im Plasma und innerhalb der Blutzellen vor. Es wurden ^{32}P-markiertes TMP, TDP und TTP synthetisiert, so daß nach Inkubation radiochemisch quantitative Angaben über den Abbau und die Resorption dieser Ester gemacht werden konnten.

Mit Hilfe der ^{32}P-markierten Thiaminphosphorsäureester, sowie des ^{35}S-Thiamin war es möglich, einen Einblick in die Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsreaktionen des Thiamins bzw. seiner Phosphatester in menschlichem Blut zu gewinnen.

IV. Eigene Untersuchungen

A. Methodik

Die Versuche wurden mit heparinisiertem Vollblut ausgeführt, das durch Venenpunktion einer gesunden männlichen Versuchsperson entnommen wurde. Zur Gewinnung von Hämolysat wurden die Erythrozyten in der Kälte mit dem gleichen Volumen H_2O versetzt. Hämolysat

*) Der Fa. Hoffmann-La Roche danke ich für die freundliche Überlassung der Substanz.

und Vollblut wurden vor dem Versuchsbeginn auf 37° C gebracht. Zur Zeit 0 wurden die Proben mit trägerfreiem ^{32}P-Orthophosphat versetzt (50 µC/ml Vollblut bzw. Hämolysat) und in kleinen Schliffkolben bei 37° C mit Luft als Gasatmosphäre im WARBURG-Apparat geschüttelt. Das ^{32}P-Orthophosphat wurde mit physiologischer NaCl-Lösung verdünnt und mit $NaHCO_3$ neutralisiert. Für die Versuche in Gegenwart von Thiamin wurde Thiaminhydrochlorid in physiologischer NaCl-Lösung gelöst und mit $NaHCO_3$ auf pH 7 gebracht. Die Endkonzentration betrug $2,5 \times 10^{-3}$ m.

Bei den Untersuchungen in Gegenwart von Na-Arsenat und 2,4-Dinitrophenol lagen diese beiden Substanzen in einer Endkonzentration von $5,8 \times 10^{-4}$ m bzw. 3×10^{-4} m vor.

Zu verschiedenen Zeiten wurden Proben entnommen und bei 0° C zentrifugiert. In aliquoten Volumina des Plasmas erfolgte nach einer Verdünnung von 1 : 500 die Bestimmung der $^{32}PO_4$-Aktivität im Flüssigkeitszählrohr FHZ 41 mit dem Strahlungsmeßgerät FH 49.

Zur Analyse der Phosphatester der Erythrozyten wurden die Blutzellen mit physiologischer NaCl-Lösung in der Kälte gewaschen. Die obersten Zellschichten wurden nach dem Zentrifugieren abgesaugt und die weitgehend leukozytenfreien Erythrozyten mit dem gleichen Volumen eiskalter 10%iger Trichloressigsäure in der Kälte aufgeschlossen. Nach Abzentrifugieren des Nierschlages wurden jeweils 0,03 ml der gewonnenen Extrakte papierchromatographisch im Trichloressigsäurelösungsmittelgemisch nach THILO und GRUNZE (60) getrennt.

Substanz	R_{PO_4}-Wert
Adenosintriphosphat	0,08
Adenosindiphosphat	0,20
Thiamintriphosphat	0,25
Dioxyacetonphosphat	0,36
Thiamindiphosphat	0,43
Glucose-1-phosphat	0,55
Glucose-6-phosphat	0,61
Fruktose-1,6-diphosphat	0,64
Fruktose-1-phosphat	0,66
Adenosinmonophosphat	0,67
Fruktose-6-phosphat	0,71
2,3 Diphosphoglycerinsäure	0,73
Glycerinaldehydphosphat	0,77
Thiaminmonophosphat	0,86
3-Phosphorglycerinsäure	0,90
Phosphoenolbrenztraubensäure	0,90

Tab. 2: R_{PO_4}-Werte von Phosphatverbindungen im Trichloressigsäurelösungsmittelgemisch. Laufzeit bei 10° C 36 - 40 Std.

Das Chromatographiepapier (SCHLEICHER und SCHÜLL 2043b) wurde nach HEALD (61) vorbehandelt. Die Laufzeit betrug bei 10° C aufsteigend etwa 36-40 Stunden. Tab. 2 zeigt die R_{PO_4}-Werte einiger Phosphorsäureester im Trichloressigsäurelösungsmittelgemisch.

Die Lokalisierung der Phosphatverbindungen erfolgte durch Autoradiographie sowie durch Phosphatfärbung nach HANES und ISHERWOOD (62). Zur quantitativen Auswertung wurden die phosphathaltigen Flecken mit einem Gemisch aus H_2SO_4 und $HClO_4$ (3 : 2) verascht (62). Im Veraschungsgemisch wurde nach einer Verdünnung von 1 : 15 die ^{32}P-Aktivität bestimmt.

Zur Identifizierung der Phosphorsäureester diente die Übereinstimmung des ^{32}P-Aktivitätsmaximums mit dem Intensitätsmaximum einer zugesetzten bekannten Trägersubstanz, die nach HANES und ISHERWOOD (62) angefärbt wurde.

Der pH-Wert des Blutes wurde nach Versuchsende mit der Glaselektrode (Metrohm) bei 20° C kontrolliert. Die ermittelten Werte wurden mit Hilfe des Temperaturkoeffizienten nach ROSENTHAL (63) auf 37° C umgerechnet: Blut-pH = pH_t - 0,0147 x (37-t).

Zur Untersuchung der Resorption von Thiamin durch Erythrozyten wurde menschlichen Vollblutproben neutralisiertes Thiaminhydrochlorid in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt. (Endkonzentrationen $2,7 \times 10^{-3}$ m, $2,0 \times 10^{-3}$ m, und $1,3 \times 10^{-3}$ m.) Zu bestimmten Zeiten wurden aliquote Volumina entnommen und bei 0° C zentrifugiert. Die Erythrozyten wurden ungewaschen mit dem doppelten Volumen 10%iger Trichloressigsäure in der Kälte aufgeschlossen. Nach Verdünnung der gewonnenen Extrakte auf 1 : 1500 erfolgte darin die Thiaminbestimmung nach einer modifizierten Thiochrommethode (64) im Photometer EPPENDORF mit Fluorometerzusatz: Primärfilter Hg 366 mμ; Sekundärfilter 450 - 3000 mμ. Mit dieser Methode kann das Thiamin in einer Konzentration von 0,05 - 0,5 γ pro Ansatz erfaßt werden. Die Fehlergrenze liegt bei ± 4 %. Sämtliche Glasgeräte wurden vorher in einer Lösung aus 1 Teil konz. H_2SO_4 und einem Teil konz. HNO_3 gereinigt.

^{35}S-Thiaminhydrochlorid (spezifische Aktivität 30 μC/mg) wurde mit heparinisiertem Vollblut unter Zusatz von isotonischer Glucoselösung bei 37° C inkubiert. Die Endkonzentration betrug $5,5 \times 10^{-3}$ m. Nach 5 Stunden wurde das Blut bei 0° C zentrifugiert. Erythrozyten und Plasma wurden mit dem gleichen Volumen 10%iger Trichloressigsäure in der Kälte aufgeschlossen.

Die Trennung der markierten Verbindungen in den Extrakten erfolgte papierchromatographisch im Trichloressigsäurelösungsmittelgemisch.

Die Thiaminverbindungen wurden autoradiographisch (Belichtungszeit des Filmes 6 Wochen), sowie mit der Thiochrommethode (64) identifiziert. Die quantitative Auswertung der ^{35}S-markierten Verbindungen erfolgte planimetrisch mit dem Radiopapierchromatographen FH 452 und dem Methandurchflußzähler FH 407.

Die ^{32}P-markierten Thiaminphosphorsäureester wurden nach GREILING und KIESOW (65) synthetisiert und in einem 0,05 m Acetatpuffer von pH 5,4 (40) papierelektrophoretisch getrennt. Die spezifische Aktivität betrug 2×10^6 Imp/min/mgP. Die markierten Ester wurden in physiologischer NaCl-Lösung gelöst und mit Vollblut, Hämolysat und Plasma bei 37° C inkubiert. In Kontrollversuchen wurde die nicht fermentative Hydrolyse der Ester unter den Versuchsbedingungen ermittelt. Die Endkonzentration der markierten Thiaminphosphorsäureester war $4,3 \times 10^{-4}$ m. Die Gewinnung der Extrakte, sowie die papierchromatographische Trennung und die ^{32}P-Aktivitätsbestimmung der markierten Verbindungen erfolgte wie bei der Inkubation von Vollblut mit $^{32}PO_4'''$ beschrieben.

B. Ergebnisse und Diskussion

1. Resorption von ^{32}P-Orthophosphat durch menschliche Erythrozyten unter physiologischen Bedingungen und in Gegenwart von Thiamin

Der Einfluß von Thiamin auf den Transport von ^{32}P-Orthophosphat aus dem Plasma in die Blutzellen geht aus Abb. 1 hervor, welche die $^{32}PO_4'''$-Aktivität im Plasma in Abhängigkeit von der Zeit zeigt. Unter physiologischen in vitro-Bedingungen fällt die Aktivität geradlinig ab (Kurve I). In Gegenwart von Thiamin zeigt sich ein veränderter Verlauf (Kurve II). Schon unmittelbar nach Versuchsbeginn ist die $^{32}PO_4'''$-Aktivität vermindert, weil offenbar markiertes Orthophosphat vermehrt in die Zellen gelangt. Danach steigt sie bis etwa zum 30-Minutenwert an und zeigt dann ebenfalls einen geradlinigen Abfall.

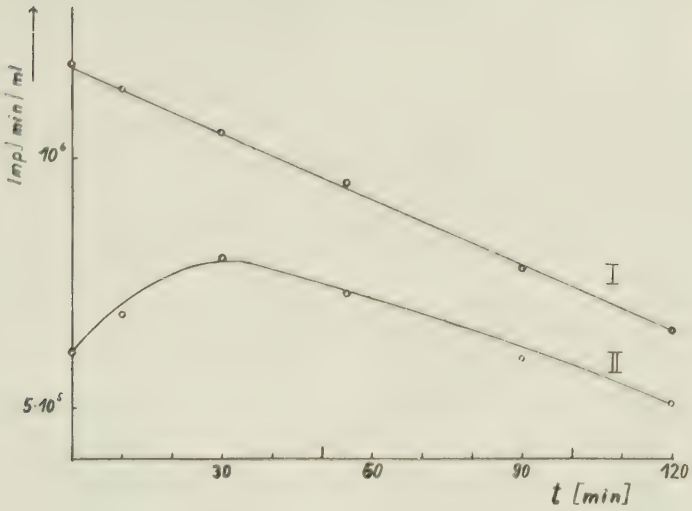


Abb. 1: Die Aktivität des ^{32}P-Orthophosphats im Plasma in Abhängigkeit von der Zeit. Kurve I unter physiologischen in vitro-Bedingungen, Kurve II nach Zusatz von Thiamin ($2,5 \times 10^{-3}$ m). Die Bestimmung der ^{32}P-Aktivität im Plasma erfolgte nach Abzentrifugieren von den Erythrozyten und nach einer Verdünnung von 1 : 500.

Abb. 2 zeigt die Aufnahme von markiertem Orthophosphat durch Erythrozyten mit und ohne Thiaminzusatz in Abhängigkeit von der Zeit.

Unter physiologischen Bedingungen bleibt die Resorption im Verlaufe von 2 Stunden relativ konstant. In Gegenwart von Thiamin kommt es anfangs zu einer stark beschleunigten Aufnahme von ^{32}P-Orthophosphat. Anschließend zeigt sich ein exponentieller Abfall der ^{32}P-Orthophosphataktivität, und die Werte mit und ohne Thiamin gleichen sich nach 90 bis 120 Minuten aneinander an.

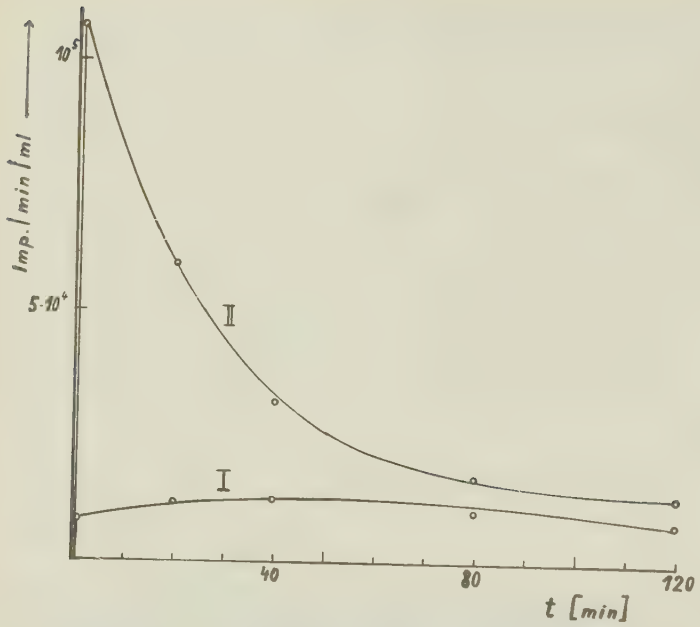


Abb. 2: Zeitlicher Verlauf der $^{32}PO_4^{'''}$-Resorption durch Erythrozyten ohne (I) und mit (II) Thiaminzusatz (Endkonzentration 2,5 x 10^{-3} m). Die Bestimmung der $^{32}PO_4^{'''}$-Aktivität erfolgte nach papierchromatographischer Auftrennung von je 0,03 ml der Trichloressigsäureextrakte der gewaschenen Erythrozyten. Der pH-Wert des Blutes betrug am Ende der Inkubationszeit 7,5.

Durch die Einwirkung des Thiamins kommt es demnach in menschlichen Erythrozyten anfangs zu einer gesteigerten Resorption von ^{32}P-Orthophosphat, worauf ein Teil desselben anschließend wieder ins Plasma gelangt(66). Wie aus Abb. 2 hervorgeht, zeigt jedoch die ^{32}P-Aktivität des intrazellulären Orthophosphats auch noch nach 2 Stunden in Gegenwart von Thiamin einen höheren Wert als unter physiologischen in vitro-Bedingungen.

2. Verteilung der $^{32}PO_4^{'''}$-markierten säurelöslichen Phosphatester in Erythrozyten und Hämolysat mit und ohne Thiaminzusatz

Der zeitliche Verlauf des $^{32}PO_4^{'''}$-Einbaus in die Phosphatfraktionen des menschlichen Erythrozyten unter physiologischen in vitro-Bedingungen, sowie nach Zusatz von Thiamin geht aus Tab. 3 hervor.

t (min)	0		120		180		300	
Substanz	I	II	I	II	I	II	I	II
ATP	20,1	16,0	23,0	19,5	30,4	20,0	43,3	21,0
ADP			9,8	11,3	5,8	6,6	2,4	3,1
Dioxyacetonphosphat			8,5	8,1	4,8	6,0	2,9	2,5
Glucose-6-phosphat			3,8	4,1	2,7	3,2	1,7	2,1
Fruktose-1,6-diphosphat			2,1	6,5	2,3	5,7	1,3	4,0
Fruktose-6-phosphat			2,7	7,4	3,1	8,3	3,6	6,3
2,3Diphosphoglycerinsäure			45,5	39,0	48,0	47,0	43,5	59,0
3-Phosphoglycerinsäure			3,3	1,7	2,3	1,8	1,0	1,5
$PO_4^{'''}$	79,9	84,0	1,3	2,4	0,6	1,4	0,3	0,5

in % der Gesamtaktivität

Tab. 3: Zeitlicher Verlauf des Einbaus von $^{32}PO_4^{'''}$ in die säurelöslichen Phosphatester des menschlichen Erythrozyten ohne (I) und mit (II) Zusatz von Thiamin ($2,5 \times 10^{-3}$ m). Die Aktivitätsbestimmung erfolgte nach papierchromatographischer Trennung von je 0,03 ml der Trichloressigsäureaufschlüsse im Lösungsmittelgemisch nach THILO und GRUNZE.

Schon zur Zeit 0 (sofortige Entnahme einer Probe nach Zugabe von $^{32}PO_4^{'''}$) findet sich das ^{32}P sowohl im intrazellulären Orthophosphat als auch im ATP.

Unter physiologischen in vitro-Bedingungen nimmt der Anteil der ^{32}P-Aktivität des ATP an der Gesamtaktivität bis zu 5 Stunden weiter zu. Die ^{32}P-Zwischenstoffkonzentration der 2,3DPGS bleibt dagegen zwischen 2 und 5 Stunden relativ konstant. Das ^{32}P-Aktivitätsverhält-

nis zwischen 2,3DPGS und ATP ist nach 2 Stunden etwa 2 : 1, nach 5 Stunden etwa 1 : 1.

In Gegenwart von Thiamin sind die ^{32}P-Zwischenstoffkonzentrationen von Fruktose-6-phosphat und Fruktose-1,6-diphosphat gegenüber physiologischen in vitro-Bedingungen erhöht. Außerdem bleibt der Anteil der ^{32}P-Aktivität des ATP an der Gesamtaktivität zwischen 2 und 5 Stunden annähernd konstant, während der Anteil der 2,3DPGS im Gegensatz zu dem Versuch ohne Thiamin ansteigt, so daß das ^{32}P-Verhältnis von 2,3DPGS zu ATP nach 5 Stunden hier etwa 3 : 1 beträgt.

Tab. 4 zeigt den Einbau von $^{32}PO_4^{'''}$ in die Phosphatester von menschlichem Hämolysat mit und ohne Zusatz von Thiamin in Abhängigkeit von der Zeit. Die angegebenen Werte können nicht direkt mit denen der Tab. 3 verglichen werden, weil in der ^{32}P-Gesamtaktivität des Hämolysats auch das extrazelluläre ^{32}P-Orthophosphat des Vollblutes enthalten ist, und weil in beiden Versuchen nicht quantitativ die gleiche Zellmasse zugrunde liegt.

t (min)	0		180		240		300		
Substanz	I	II	I	II	I	II	I	II	
ATP - ADP	7,9	8,4	12,7	13,0	14,0	15,3	16,0	17,0	
Dioxyacetonphosph.			2,6	1,5	2,4	2,0	2,4	2,5	
Glucose-6-ph.			1,1	1,0	1,1	1,1	1,0	1,7	in %
Fruktose-1,6-diph.			0,6	1,5	0,3	1,6	0,6	1,5	der
2,3-DPGS			28,0	31,0	30,0	36,0	33,0	37,0	GSA.
$PO_4^{'''}$	92,1	91,6	56,0	51,0	52,0	44,0	47,0	40,3	

Tab. 4: $^{32}PO_4^{'''}$-Verteilungsschema in menschlichem Hämolysat ohne (I) und mit (II) Thiaminzusatz ($2,5 \times 10^{-3}$ m) in Abhängigkeit von der Zeit. Die Erythrozyten wurden mit dem aliquoten Volumen H_2O hämolysiert. Auswertung wie bei Tab. 3 angegeben.

Ein Vergleich der ^{32}P-Aktivitätsverhältnisse zwischen einzelnen Phosphatestern in Tab. 3 mit den entsprechenden in Tab. 4 zeigt jedoch, daß im Hämolysat der ^{32}P-Einbau reduziert ist.

Der Zusatz von Thiamin zum Hämolysat führt insbesondere zur Erhöhung der ^{32}P-Zwischenstoffkonzentration des Fruktose-1,6-diphosphats, sowie allgemein zu einem leicht erhöhten $^{32}PO_4^{'''}$-Einbau in die Phosphatester.

Möglicherweise kommt es durch die Hämolyse zu Aktivitätsveränderungen von Glykolysefermenten, die zu einem reduzierten Stoffwechsel führen. Eine Aktivierung von ATPasen, die in diesem Zusammenhang diskutiert wurde (67), trifft jedoch nicht zu, denn frisches Hämolysat enthält etwa die gleiche ATP-Konzentration wie frisch entnommenes Vollblut (68).

3. Einfluß von 2,4-Dinitrophenol und Arsenat auf den Phosphatstoffwechsel in menschlichen Erythrozyten

Abb. 3 zeigt die Einwirkung von 2,4-Dinitrophenol und Arsenat auf die $^{32}PO_4^{'''}$-Resorption in menschlichen Erythrozyten.

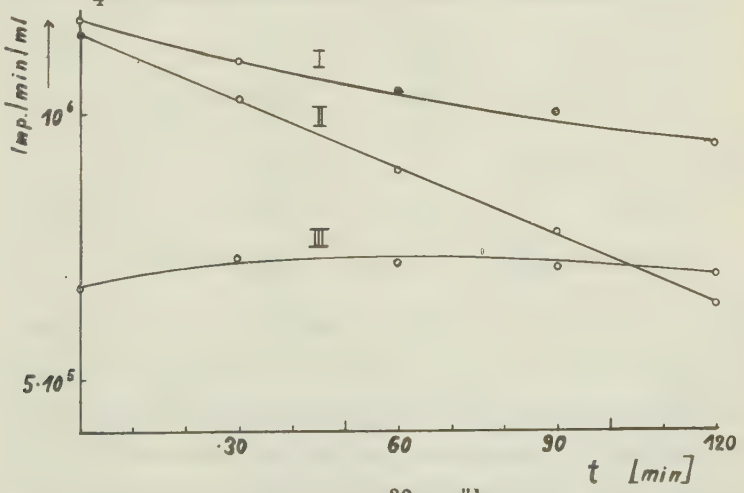


Abb. 3: Die zeitliche Abnahme der $^{32}PO_4^{'''}$-Aktivität im Plasma unter physiologischen in vitro-Bedingungen (II), sowie nach Zusatz von (I) Arsenat ($5,8 \times 10^{-4}$ m) und (III) 2,4-Dinitrophenol (3×10^{-4} m). Das Plasma wurde zu verschiedenen Zeiten von den Erythrozyten abzentrifugiert, verdünnt und darin die ^{32}P-Aktivität bestimmt.

Die ^{32}P-Aktivität im Plasma ist in Gegenwart von Arsenat (Kurve I) gegenüber normalen Bedingungen (Kurve II) besonders zwischen 60 und 120 Minuten erhöht. Der Aktivitätsabfall ist reduziert.

Nach Zusatz von 2,4-Dinitrophenol (Kurve III) ist die Aktivität des extrazellulären $^{32}PO_4'''$ anfangs stark erniedrigt und bleibt innerhalb von 2 Stunden relativ konstant.

Der Einbau von ^{32}P-Orthophosphat in die Phosphatester von Erythrozyten und Hämolysat ist in Gegenwart von 2,4-Dinitrophenol gegenüber physiologischen in vitro-Bedingungen nicht verändert.

In Gegenwart von Arsenat kommt es zu einer Schädigung der Glykolyse innerhalb der Erythrozyten. Nach O. WARBURG (32) hemmt das Arsenat die Blutglykolyse an der Stelle des Glycerinaldehydphosphates. Es wird eine arsenylierte Phosphoglycerinsäure gebildet, die spontan in 3-Phosphoglycerinsäure und Arsenat zerfällt:

(1) $CHO \cdot CHOH \cdot CH_2\text{-}O\text{-}PO_3H_2 + H_3AsO_4 + DPN \longrightarrow CO\text{-}O\text{-}AsO_3H_2 \cdot CHOH \cdot CH_2\text{-}O\text{-}PO_3H_2 + DPNH_2$

(2) $CO\text{-}O\text{-}AsO_3H_2 \cdot CHOH \cdot CH_2\text{-}O\text{-}PO_3H_2 + H_2O \longrightarrow COOH \cdot CHOH \cdot CH_2\text{-}O\text{-}PO_3H_2 + H_3AsO_4$

Dadurch verliert die Zelle pro Mol Glucose 2 Mol ATP, so daß unter diesen Bedingungen nicht mehr genügend Energie für den aktiven Transport des $^{32}PO_4'''$ in die Erythrozyten bereitgestellt werden kann.

Der Einfluß des 2,4-Dinitrophenols auf die Resorption von $^{32}PO_4'''$ durch rote Blutzellen ist unter Umständen darauf zurückzuführen, daß die Erythrozytenmembran durch diese Substanz verändert wird. Dadurch gelangt wahrscheinlich das Phosphat anfangs beschleunigt in die Blutzellen.

4. Resorption von Thiamin in menschlichen Erythrozyten

Abb. 4 zeigt die Aufnahme von Thiamin durch menschliche Erythrozyten in Abhängigkeit von der Zeit bei verschiedenen Thiaminkonzentrationen im Plasma. Der Kurvenverlauf ist zweiphasisch. In der ersten Phase bis zu einer Inkubationszeit von einer Stunde wird verhältnismäßig wenig Thiamin aufgenommen, in der zweiten ist jedoch die Geschwindigkeit der Thiaminresorption erhöht. Unabhängig von der Thiaminkonzentration im Plasma nehmen die Blutzellen in der Zeiteinheit die gleiche Menge Thiamin auf.

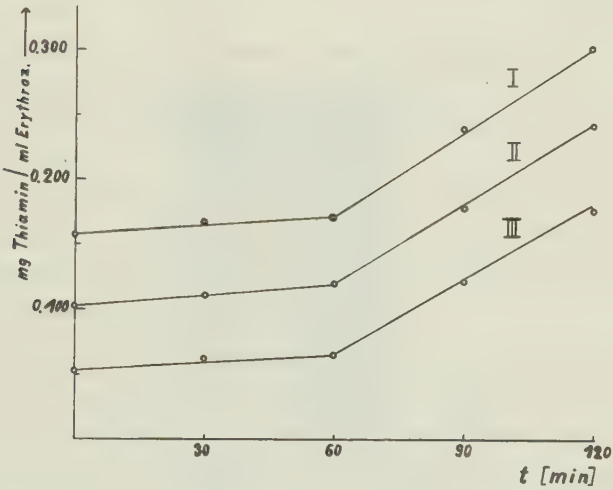


Abb. 4: Zeitliche Aufnahme von Thiamin durch menschliche Erythrozyten in Abhängigkeit von der Thiaminkonzentration im Plasma. Endkonzentrationen im Vollblut $2,7 \times 10^{-3}$ m (Kurve I), $2,0 \times 10^{-3}$ m (Kurve II), $1,3 \times 10^{-3}$ m (Kurve III). Die Erythrozyten wurden mit dem doppelten Volumen 10%iger Trichloressigsäure aufgeschlossen. Die Thiaminbestimmung erfolgte in den verdünnten Extrakten nach der Thiochrommethode.

Die Unabhängigkeit der Thiaminresorption von der extrazellulären Thiaminkonzentration spricht für einen aktiven Transportmechanismus.

5. Biosynthese von Thiaminphosphorsäureestern in menschlichem Vollblut

Menschliches Vollblut wurde unter physiologischen in vitro-Bedingungen mit ^{35}S-Thiaminhydrochlorid inkubiert. Abb. 5 zeigt ein Autoradiogramm nach papierchromatographischer Trennung der aus Erythrozyten und Plasma gewonnenen Trichloressigsäureextrakte. Im Plasma konnten 4, in den Erythrozyten 6 ^{35}S-markierte Verbindungen getrennt werden.

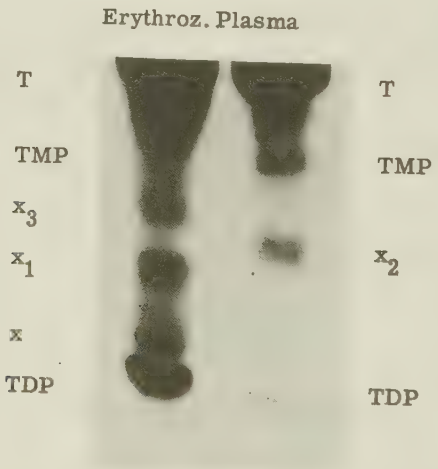


Abb. 5: Inkubation von menschlichem Vollblut mit ^{35}S-Thiamin (spezifische Aktivität 30 µC/mg). Nach 5 Stunden wurden Erythrozyten und Plasma getrennt mit 10%iger Trichloressigsäure aufgeschlossen. Autoradiogramm nach papierchromatographischer Trennung im Lösungsmittelgemisch nach THILO und GRUNZE (60).

Thiamin, TMP und TDP konnten durch die Thiochrommethode (64) identifiziert werden. TTP ließ sich unter den Versuchsbedingungen nicht nachweisen.

Tab. 5 zeigt die quantitative Verteilung der ^{35}S-Aktivität auf die einzelnen markierten Verbindungen. Ein Zerfall des ^{35}S-Thiamins während der Inkubationsdauer wurde durch einen Kontrollversuch ausgeschlossen.

Substanzen	Erythrozyten	Plasma	
TDP	2,7	0,4	
x	0,5	-	
x_1	1,0	-	
x_2	-	0,7	in % der Gesamt-
x_3	0,5	-	aktivität
TMP	1,3	0,9	
Thiamin	94,0	98,0	

Tab. 5: Verteilung von ^{35}S-markierten Verbindungen in Erythrozyten und Plasma nach 5-stündiger Inkubation von menschlichem Vollblut mit ^{35}S-Thiaminhydrochlorid. Die Verbindungen wurden im Trichloressigsäurelösungsmittelgemisch papierchromatographisch getrennt. Die quantitative Auswertung erfolgte mit dem Radiopapierchromatographen und dem Methandurchflußzähler.

TDP und TMP werden in den roten Blutzellen gebildet und sind in vermindertem Maße auch im Plasma zu finden. Die übrigen markierten Verbindungen konnten noch nicht identifiziert werden. Es handelt sich dabei nicht um Oxythiamin- oder Thiamindisulfidphosphorsäureester, die im Trichloressigsäurelösungsmittelgemisch die gleichen R_F-Werte haben wie die entsprechenden Thiaminphosphorsäureester. Die fraglichen Verbindungen könnten Thiazolderivate sein, die JACONO et al. (69) nach Injektion von ^{14}C-markiertem Thiamin an Ratten in den Geweben der Tiere nachwiesen.

6. Inkubation von ^{32}P-markierten Thiaminphosphorsäureestern mit Vollblut, Hämolysat und Plasma

Tab. 6 zeigt den Abbau ^{32}P-markierter Thiaminphosphorsäureester unter physiologischen Bedingungen durch Vollblut, Hämolysat und Plasma in Abhängigkeit von der Zeit.

Inkubierte Substanz	Zeit (h)	Vollblut	Hämolysat	Plasma	
TM ^{32}P	0	96	98	98	
	1	94	87	94	
	2	90	83	86	in %
TD ^{32}P	0	97	99	98	der
	1	85	98	82	Ge-
	2	76	97	57	samt-
TT ^{32}P	0	98	97	98	aktivi-
	1	95	96	93	tät
	2	93	97	88	

Tab. 6: Abbau von ^{32}P-markierten Thiaminphosphorsäureestern durch Vollblut, Hämolysat und Plasma unter physiologischen in vitro-Bedingungen. Die Endkonzentration der Ester war $4,3 \times 10^{-4}$ m. Spezifische Aktivität 2×10^{6} Imp/min/mgP. Die Bestimmung der ^{32}P-Aktivitäten erfolgte nach papierchromatographischer Trennung im Lösungsmittelgemisch nach THILO und GRUNZE (60). Der chemische Zerfall der Thiaminphosphorsäureester wurde in Kontrollversuchen ermittelt. Die angegebenen Werte beziehen sich ausschließlich auf die fermentative Hydrolyse.

Im Hämolysat wird markiertes TMP teilweise abgebaut, während markiertes TDP und TTP kaum verändert werden.

Im Plasma ist die ^{32}P-Aktivität des markierten TDP nach zwei Stunden um etwa 40 % reduziert, die des TM ^{32}P um 12 % und die des TT ^{32}P um 10 %.

Im Vollblut werden die markierten Thiaminphosphorsäureester langsamer abgebaut, aber in der gleichen Reihenfolge wie im Plasma.

Die Thiaminphosphorsäureester können die Erythrozytenmembran nicht durchdringen.

Die Ergebnisse zeigen, daß Phosphatasen innerhalb der Erythrozyten unter den Thiaminphosphorsäureestern bevorzugt TMP spalten. Die Aktivität der Piasmaphosphatasen gegenüber den drei Thiaminestern, insbesondere aber TDP, ist größer als die Aktivität der Zellphosphatasen. Im Vollblut werden die Thiaminphosphorsäureester vorwiegend durch Plasmaphosphatasen abgebaut. Eine Hydrolyse durch Phosphatasen, die in der Erythrozytenmembran lokalisiert sind, ist nicht völlig auszuschließen, hat aber quantitativ offenbar keine größere Bedeutung.

In der vorliegenden Arbeit werden die Befunde von RHODEWALD und WEBER (70, 71) sowie MACHO (72) nicht bestätigt, die in menschlichen Erythrozyten kein ADP nachweisen konnten. Die markierten Adeninnucleotide ATP und ADP lassen sich aus Erythrozytenextrakten im Trichloressigsäurelösungsmittelgemisch papierchromatographisch trennen und identifizieren. Dieses Ergebnis steht in Einklang mit denen von GOURLEY (26), PRANKERD und ALTMAN (23), sowie GERLACH et al. (25).

Der Einwand von SCHILD und MAURER (73), daß Trichloressigsäureextrakte von Erythrozyten falsche Orthophosphatwerte durch Hydrolyse von Kreatinphosphat ergeben, kann ebenfalls nicht bestätigt werden. Auch nach längerer Inkubationsdauer zeigt sich keine zunehmende Erhöhung des intrazellulären $^{32}PO_4^{'''}$, wie sie bei Säurehydrolyse von markiertem Kreatinphosphat, dessen ^{32}P-Aktivität nach einer Stunde ein Maximum zeigt (73), zu erwarten wäre. Damit werden die Befunde von EGGLETON und EGGLETON (74), KERR und DAOUD (75) und GERLACH et al. (25) bestätigt, die im Gegensatz zu SCHILD und MAURER (73), sowie HOFMANN-CREDNER (76) in Erythrozyten kein Kreatinphosphat nachweisen konnten.

Aus dem Einbau von $^{32}PO_4^{'''}$ in die Phosphatfraktionen des Erythrozyten kann bei der verwendeten Methodik nicht unmittelbar ersehen

werden, ob die Glucose in glykolysierenden roten Blutzellen vorwiegend über die 2,3DPGS abgebaut wird oder nicht. Der Befund, daß schon sofort nach Zugabe von $^{32}PO_4^{'''}$ das ATP markiert ist, spricht jedoch für die von GERLACH et al. (25) vertretene Theorie, nach der die 1,3PGS in Erythrozyten in der Hauptsache direkt zu 3-PGS abgebaut wird.

Die vermehrte Resorption von ^{32}P-Orthophosphat durch menschliche Erythrozyten in Gegenwart von Thiamin kann einmal durch eine veränderte Permeabilität der Erythrozytenmembran bedingt sein. Ein Diffusionsgleichgewicht zwischen extra- und intrazellulärem $^{32}PO_4^{'''}$ stellt sich jedoch nicht ein.

Zum anderen handelt es sich bei dem beobachteten Effekt möglicherweise um einen aktiven Transportmechanismus unter Mitwirkung von Thiaminphosphorsäureestern. TTP konnte unter den vorliegenden Versuchsbedingungen nicht nachgewiesen werden und scheidet demnach für eine solche Funktion aus. Von Interesse ist jedoch in dieser Hinsicht der Befund, daß nach Inkubation von Vollblut mit Thiamin TDP auch im Plasma nachgewiesen wurde. Dort kann es nicht synthetisiert werden, da kein ATP zur Verfügung steht. Es ist daher anzunehmen, daß die Phosphorylierung des Thiamins zu TDP teilweise an der äußeren Membran der roten Blutzellen erfolgt. Die Erythrozytenmembran ist für die Ester nicht durchlässig. Das TDP kann jedoch durch Plasmaphosphatasen abgebaut und innerhalb der Blutzellen sekundär wieder synthetisiert werden. Die Phosphataseaktivität gegenüber Thiaminpyrophosphat ist dort weitaus geringer als im Plasma.

Es ist möglich, daß das TDP im Zusammenhang mit diesen Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsreaktionen eine Funktion beim Phosphattransport in die Erythrozyten hat.

Der Einfluß des Thiamins auf die Verteilung der ^{32}P-markierten Phosphorsäureester innerhalb der Erythrozyten besteht wahrscheinlich vorwiegend in einer Aktivierung der Transketolase. Dafür spricht die gefundene Erhöhung der ^{32}P-Zwischenstoffkonzentrationen von Fruk-

tose-6-phosphat und Fruktose-1,6-diphosphat. Auch BRUNS (28) fand nach Stimulierung des HORECKER-Zyklus durch Zusatz von Ribosephosphat in menschlichem Hämolysat u.a. eine Anreicherung dieser beiden Ester.

Die gefundene Wirkung des Thiamins auf den Phosphatstoffwechsel kann nicht darauf zurückzuführen sein, daß in Gegenwart von Thiamin innerhalb der Zellen mehr Phosphat zur Verfügung steht. Auch nach Zusatz von 2,4-Dinitrophenol gelangt vermehrt $^{32}PO_4^{'''}$ in die Blutzellen, ohne daß jedoch das ^{32}P-Verteilungsschema der Phosphatester innerhalb der Erythrozyten geändert wird. Außerdem zeigt sich auch im Hämolysat, d.h. unabhängig von der $^{32}PO_4^{'''}$-Resorption, eine Erhöhung der ^{32}P-Zwischensotffkonzentration von Fruktose-1,6-diphosphat. Eine Hemmung oder Aktivierung von Fermenten, die die Hexosephosphorsäureester innerhalb der Glykolyse bilden bzw. spalten, durch Thiamin liegt nicht vor. Zusätze von Thiamin, TMP und TDP bleiben ohne Einfluß auf die Aktivitäten von Hexokinase, Fruktokinase und Aldolase.

In Gegenwart von Thiamin wird demnach in den Erythrozyten vermehrt TDP gebildet, das bei Fehlen des vollständigen Zitronensäurezyklus in kernlosen roten Blutzellen (77) vorwiegend als Co-Ferment der Transketolase von Bedeutung ist. Dieses Ferment wird dadurch aktiviert, und es kommt zur Erhöhung der ^{32}P-Zwischenstoffkonzentrationen insbesondere von Fruktose-6-phosphat und Fruktose-1,6-diphosphat.

Es kann noch nicht entschieden werden, ob außerdem nach Thiaminzusatz ein allgemein erhöhter $^{32}PO_4^{'''}$-Einbau in die Phosphatfraktionen erfolgt. Dabei könnten Thiaminphosphorsäureester an Transphosphorylierungsreaktionen beteiligt sein. Der geringe Abbau der Ester im Hämolysat, sowie die Tatsache, daß TTP nicht nachgewiesen werden konnte, sprechen allerdings dagegen. Denn insbesondere für diesen Thiaminphosphorsäureester wird eine mögliche Funktion bei Transphosphorylierungen diskutiert (53, 78).

C. Zusammenfassung

Thiamin erhöht die Aufnahme von ^{32}P-Orthophosphat durch menschliche Erythrozyten.

Es wurde ein eindimensionales papierchromatographisches Verfahren beschrieben, das die Trennung der säurelöslichen Phosphatfraktionen des Erythrozyten ermöglicht.

In Gegenwart von Thiamin ist in Erythrozyten die ^{32}P-Aktivität von Fruktose-6-phosphat und Fruktose-1,6-diphosphat und im Hämolysat die von Fruktose-1,6-diphosphat gegenüber normalen in vitro-Bedingungen erhöht. Dieser Befund wurde auf eine gesteigerte Transketolaseaktivität nach Inkubation mit Thiamin zurückgeführt.

Unabhängig von der Plasmakonzentration des Thiamins wird von menschlichen Erythrozyten unter physiologischen Bedingungen in der Zeiteinheit die gleiche Menge Thiamin resorbiert.

Nach Inkubation von Vollblut mit ^{35}S-Thiamin wurden im Plasma 4 und in den Erythrozyten 6 ^{35}S-markierte Verbindungen autoradiographisch nachgewiesen. Thiamin, TMP und TDP konnten in Erythrozyten und im Plasma identifiziert werden, TTP dagegen nicht.

Es wurden ^{32}P-markierte Thiaminphosphorsäureester synthetisch dargestellt und der fermentative Abbau von TT^{32}P, TD^{32}P und TM^{32}P im Vollblut, Plasma und Hämolysat radiochromatographisch verfolgt. Im Hämolysat wurde eine TMPase nachgewiesen, dagegen wurden TTP und TDP nicht signifikant desphosphoryliert. Im Plasma und im Vollblut wurden die Thiaminphosphorsäureester in der Reihenfolge TDP $>$ TMP $>$ TTP abgebaut.

TTP, TDP und TMP können die Erythrozytenmembran nicht durchdringen.

D. Experimenteller Teil

1. + 2. Zur Resorption von ^{32}P-Orthophosphat durch menschliche Erythrozyten in Gegenwart von Thiamin und zur Verteilung der $^{32}PO_4^{"'}$-markierten säurelöslichen Phosphatester in Erythrozyten und Hämolysat mit und ohne Thiaminzusatz

Je 5 ml frisch entnommenes heparinsiertes menschliches Vollblut wurden nach einer Vorinkubation von 5 Minuten im WARBURG-Apparat bei 37° C inkubiert. Es wurden je 0,5 ml physiologischer NaCl-Lösung, in der 5 mg Thiaminhydrochlorid gelöst waren, sowie 0,5 ml 0,9 %iger Na-Cl-Lösung, die etwa 300µC trägerfreies ^{32}P-Orthophosphat enthielten, hinzugesetzt. Die Zusätze wurden vorher mit Natriumbicarbonat neutralisiert. In einem Kontrollversuch wurden anstelle der Thiaminlösung 0,5 ml physiologischer NaCl-Lösung zugegeben.

Zur Zeit 0 (d.h. unmittelbar nach Zugabe des $^{32}PO_4^{"'}$), nach 10, 30, 60, 90 und 120 Minuten wurde den Proben je 1 ml entnommen, im Eisbad vorgekühlt und 5 Minuten bei 0° C und 2500 U/min zentrifugiert.

In je 0,2 ml Plasma wurde nach einer Verdünnung mit H_2O auf 100 ml die ^{32}P-Aktivität mit dem Flüssigkeitszählrohr FHZ 41 im Strahlungsmeßgerät FH 49 bestimmt.

Das restliche Plasma der Proben und die obersten Lagen der Blutzellen, die sich vorwiegend aus Leukozyten zusammensetzen, wurden abpipettiert. Die übrigen Blutzellen wurden zweimal mit je 10 ml eiskalter physiologischer NaCl-Lösung gewaschen und jeweils 5 Minuten bei 2500 U/min und einer Temperatur von 0° C abzentrifugiert. Die obersten Zellagen wurden wiederum abpipettiert. Je 0,5 ml der gewaschenen, leukozytenfreien Erythrozyten wurden mit den gleichen Volumina eiskalter 10%iger Trichloressigsäure in der Kälte gefällt. Der Niederschlag wurde 10 Minuten bei 2500 U/min abzentrifugiert.

Je 0,03 ml der gewonnenen Extrakte wurden im Trichloressigsäurelösungsmittelgemisch nach THILO und GRUNZE (60) chromatographiert: Isopropanol : H_2O : Trichloressigsäure (20 %ig) : Ammoniak (25 %ig)

35,5 : 4,5 : 10 : 0,15. Die Laufzeit betrug aufsteigend bei 10° C etwa 36 - 40 Stunden.

Die quantitative Auswertung der autoradiographisch ermittelten Phosphatverbindungen erfolgte nach Veraschen der entsprechenden Bezirke des Chromatogramms mit je 4 ml eines Gemisches aus 3 Teilen konz. Schwefelsäure und 2 Teilen konz. Perchlorsäure (62). Das Veraschungsgemisch wurde mit H_2O auf 20 ml verdünnt und die ^{32}P-Aktivität im Flüssigkeitszählrohr FHZ 41 mit dem Strahlungsmeßgerät FH 49 gemessen.

Zur Identifizierung der ^{32}P-markierten Phosphatverbindungen wurden je 50 γ bekannter Phosphatester in 0,02 ml H_2O gelöst und zusammen mit je 0,03 ml des Erythrozytenextraktes chromatographiert.

In einer weiteren Versuchsreihe wurden je 5 ml Vollblut mit und ohne Thiamin unter Zusatz von je 0,2 ml einer isotonischen Glucoselösung (0,3 m) bei sonst gleichen Versuchsbedingungen 5 Stunden im WARBURG-Apparat geschüttelt. Zur Zeit 0, nach 2, 3 und 5 Stunden wurde den Proben je 1 ml entnommen.

Zur Gewinnung von Hämolysat wurden 5 ml leukozytenfreie Erythrozyten im Eisbad vorgekühlt und in der Kälte mit 5 ml eiskaltem H_2O versetzt. Das Hämolysat wurde anschließend 10 Minuten bei 37° C vorinkubiert.

Je 5 ml Hämolysat wurden unter den gleichen Versuchsbedingungen und mit den gleichen Zusätzen wie Vollblut bei 37° C im Wasserbad inkubiert. Zur Zeit 0, nach 3, 4 und 5 Stunden wurde den Proben 1 ml entnommen und mit dem aliquoten Volumen eiskalter 10%iger Trichloressigsäure in der Kälte aufgeschlossen. Die Aufarbeitung der Extrakte erfolgte wie beim Vollblut beschrieben.

3. Zum Einfluß von 2,4-Dinitrophenol und Arsenat auf den Phosphatstoffwechsel in menschlichen Erythrozyten

Je 4 ml heparisiertes Vollblut wurden mit 0,5 ml physiologischer NaCl-Lösung, die etwa 250 µC trägerfreies ^{32}P-Orthophosphat ent-

hielten, sowie 0,5 ml einer $5,8 \times 10^{-3}$ m Natriumarsenatlösung bzw. 0,5 ml einer 3×10^{-3} m 2,4-Dinitrophenollösung 2 Stunden bei 37° C im WARBURG-Apparat inkubiert. In einem Kontrollversuch wurden anstelle der Lösungen der Zellgifte 0,5 ml physiologischer NaCl-Lösung hinzugesetzt. Zur Zeit 0, nach 30, 60, 90 und 120 Minuten wurde jeweils 1 ml entnommen und wie oben beschrieben behandelt.

4. Zur Resorption von Thiamin in menschlichen Erythrozyten

Je Ansatz wurden 5 ml heparisiertes Vollblut mit 5,0, 3,75 und 2,5 mg Thiaminhydrochlorid, die in je 0,5 ml physiologischer NaCl-Lösung gelöst waren, bei 37° C im WARBURG-Apparat geschüttelt. Die Zusätze wurden vorher mit Natriumbicarbonat neutralisiert. Zur Zeit 0, nach 30, 60, 90 und 120 Minuten wurde je 1 ml entnommen. Nach Abkühlen im Eisbad wurden die Blutzellen etwa 8 Minuten bei 4000 U/min und 0° C vom Plasma abzentrifugiert. Das Plasma und die obersten Zellagen wurden abgesaugt. Die Erythrozyten wurden abpipettiert und mit den doppelten Volumina eiskalter 10%iger Trichloressigsäure in der Kälte aufgeschlossen. Die gewonnenen Extrakte wurden mit H_2O auf 1 : 50 verdünnt. In je 0,1 ml dieser Lösung wurde das Thiamin im Photometer EPPENDORF mit Fluorometriezusatz nach einer modifizierten Thiochrommethode (64) bestimmt: 1 ml alkalische Ferricyanidlösung (3 ml 1%ige $K_3Fe(CN)_6$-Lösung + 97 ml 15%ige NaOH) wurde mit 1 ml Äthanol (97%ig) und 1 ml Testlösung in der Küvette zusammengegeben.

5. Zur Biosynthese von Thiaminphosphorsäureestern in menschlichem Vollblut

0,5 ml heparisiertes Vollblut wurden mit 1 mg ^{35}S-Thiaminhydrochlorid (spezifische Aktivität etwa 30 µC/mg), 0,015 ml isotonischer Glucoselösung und 0,48 mg Natriumbicarbonat bei 37° C inkubiert. Nach 5 Stunden wurde das Blut im Eisbad vorgekühlt und bei 0° C 5 Minuten zentrifugiert (2500 U/min). Je 0,2 ml Plasma und Erythrozyten wurden in der Kälte mit den gleichen Volumina 10%iger Trichloressigsäure gefällt. Je 0,03 ml der Extrakte wurden im Trichloressigsäurelösungs-

mittelgemisch chromatographiert. Als Vergleichssubstanzen wurden Thiamin, Oxythiamin, die entsprechenden Mono-, Di- und Triphosphatester, 4-Methyl-5-oxyäthylthiazol, sowie Thiamin-, TMP- und TDP-disulfid aufgetragen. Die Laufzeit betrug aufsteigend bei 10° C etwa 35 Stunden. Die Oxythiaminphosphorsäureester wurden nach der Methode von VISCONTINI (79) synthetisiert.

Die Bestimmung der Thiaminverbindungen erfolgte nach einer modifizierten Thiochrommethode (65): Das Chromatogramm wurde mit einem Gemisch aus 0,5 ml 2,5%iger Kaliumferricyanidlösung, 10 ml 10%ige NaOH und 20 ml Methanol besprüht. Anschließend wurden die thiaminhaltigen Verbindungen unter der U. V. -Lampe identifiziert.

6. Zur Inkubation von ^{32}P-markierten Thiaminphosphorsäureestern mit Vollblut, Hämolysat und Plasma

Die ^{32}P-markierten Thiaminphosporsäureester wurden nach GREILING und KIESOW (65) synthetisiert: 0,5 ml einer 84%igen Orthophosphorsäurelösung wurden mit 5 mC trägerfreier $^{32}PO_4'''$-Lösung in einem Duranglaskolben bis zur eben beginnenden Trübung erhitzt. 250 mg Thiaminhydrochlorid wurden dem vorher abgekühlten Gemisch bei 105° C auf dem Ölbad nach und nach zugesetzt. Die Temperatur wurde etwa 15 Minuten konstant gehalten. Nach Abkühlen auf Zimmertemperatur wurde das Gemisch in 15 ml eiskaltem Wasser aufgenommen und bei 0° C in 200 ml Aceton-Alkohol (2 : 1) unter Rühren eingetragen. Der entstandene weiße flockige Niederschlag wurde 5 Minuten bei 2500 U/min abzentrifugiert und in wenig H_2O aufgenommen. Die unlöslichen Bestandteile wurden abzentrifugiert. Die Lösung wurde unter Zusatz von wenig konzentrierter HCl erneut in 200 ml Aceton-Alkohol (2 : 1) eingetragen. Das Reaktionsgemisch wurde im Exikator getrocknet.

Die markierten Thiaminphospharsäureester wurden papierelektrophoretisch in einem 0,05 m Acetatpuffer von pH 5,4 (40) getrennt. 7 mg des Gemisches wurden in 0,2 ml H_2O gelöst und strichförmig auf einen Papierstreifen (SCHLEICHER und SCHÜLL 2043b) aufgetragen. Die

Laufzeit betrug bei einem Spannungsgefälle von 10 Vcm^{-1} 6 Stunden. Die getrennten Substanzen wurden mit einer Minerallampe identifiziert. Die entsprechenden Bezirke wurden ausgeschnitten und die Substanzen daraus mit wenig physiologischer NaCl-Lösung eluiert.

Je 1 ml Eluat enthielt 300 γ $TM^{32}P$, 370 γ $TD^{32}P$ bzw. 440 γ $TT^{32}P$ und wurde mit den gleichen Volumina Vollblut, Hämolysat und Plasma bei 37° C inkubiert. In Kontrollversuchen wurde nach Zusatz von 1 ml physiologischer NaCl-Lösung die Hydrolyse der Thiaminphosphorsäureester unter den Versuchsbedingungen bestimmt.

Zur Zeit 0, nach 1 und 2 Stunden wurden je 0,2 ml den Proben entnommen und mit den gleichen Volumina eiskalter 10%iger Trichloressigsäure gefällt. Die chromatographische Trennung und die ^{32}P-Aktivitätsbestimmung erfolgten wie bei der Inkubation von Vollblut mit $^{32}PO_4'''$ beschrieben.

V. Literaturverzeichnis

(1) WARBURG, O.: Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 59, 112 (1909)

(2) MACLEOD, J.J.R.: J. Biol. Chem. 15, 497 (1913)

(3) HARROP, G.A. und E.S.G. BARRON: J. Exp. Med. 48, 207 (1928)

(4) PRANKERD, T.A.J.: Brit. J. Haematol. 1, 131 (1955)

(5) BARRENSCHEEN, H.K. und K. BRAUN: Biochem. Z. 231, 144 (1931)
BARRENSCHEEN, H.K. und W. FILZ: Biochem. Z. 240, 409 (1931)
BARRENSCHEEN, H.K. und K. HÜBNER: Biochem. Z. 229, 329 (1930)

(6) DISCHE, Z.: Naturwissensch. 22, 417, 776, 855 (1934)

(7) ROCHE, A. et J. ROCHE: Bull. Soc. chim. biol. 15, 520 (1933)

(8) SCHUCHARDT, W. und A. VERCELLONE: Biochem. Z. 272, 437 (1934)

(9) BRAUNSTEIN, A.E.: Biochem. Z. 272, 21 (1934)

(10) RAPOPORT, S. und G.M. GUEST: J. Biol. Chem. 129, 781 (1939)

(11) GREENWALD, J.: J. Biol. Chem. 63, 339 (1925)

(12) JOST, H.: Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 165, 171 (1927)

(13) RAPOPORT, S. und L. LUEBERING: J. Biol. Chem. 183, 507 (1950)

(14) RAPOPORT, S. und L. LUEBERING: J. Biol. Chem. 189, 683 (1951)

(15) RAPOPORT, S. und L. LUEBERING: J. Biol. Chem. 196, 583 (1952)

(16) RAPOPORT, S.: Biochem. Z. 326, 231 (1955)

(17) LÖHR, G.W., H.D. WALLER und O. KARGES: Klin. Wschr. 35, 871 (1957)

(18) WALLER, H.D., G.W. LÖHR und M. TABATABAI: Klin. Wschr. 35, 1022 (1957)

(19) GUEST, G.M. und S. RAPOPORT: Physiol. Rev. 21, 410 (1941)

(20) SUTHERLAND, W., T. POSTERNAK und C. CORI: J. Biol. Chem. 181, 153 (1949)

(21) HEVESY, G. und A.H.W. ATEN: Kgl. Danske Vidensk, Selskab., Biol. Med. 14, 5 (1939)

(22) HEVESY, G. und L. HAHN: Kgl. Danske Vidensk, Selskab. Biol. Med. 15, 7 (1940)

(23) PRANKERD, T.A.J. und J.K. ALTMAN: Biochem.J. 58, 622 (1954)

(24) BARTLETT, G.R. und A.A. MARLOW: J.Labor.a. Clin. Med. 42, 188 (1953)

(25) GERLACH, E., A. FLECKENSTEIN und E. GROSS: Pflügers Arch. 266, 528 (1958)

(26) GOURLEY, D.R.H.: Arch. Biochem. Biophys. 40, 1 (1952)

(27) DISCHE, Z.: Phosphorus Metabilism I, 171, Johns Hopkins Press Baltimore (1951)

(28) BRUNS, T.H., E. NOLTMANN und E. VAHLHAUS: Biochem. Z. 330, 483 (1958)

(29) HORECKER, B.L., P.Z. SMYRNIOTIS und J.E. SEEGMILLER: J.Biol.Chem. 193, 383 (1951)

(30) DICKENS, F. und G.E. GLOCK: Nature (Lond.) 166, 33 (1950)

(31) BARRON, E.S.G. und G.A. HARROP: J.Biol.Chem. 79, 65 (1928)

(32) WARBURG, O.: Wasserstoffübertragende Fermente, Berlin 1948

(33) BRIN, M. und R.H. YONEMOTO: J.Biol.Chem. 230, 307 (1958)

(34) KIESE, M.: Biochem.Z. 316, 264 (1944)

(35) FUNK, C.: J.Physiol. 45, 75 (1912)

(36) NEUBERG, C. und L.KARCZAG: Biochem.Z. 36, 68 (1911)

(37) AUHAGEN, E.: Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 204, 149 (1932)

(38) LOHMANN, K. und P. SCHUSTER: Naturwissensch. 25, 26 (1937) Biochem.Z. 214, 188 (1937)

(39) KIESSLING, K.-H.: Inaug.Diss., Uppsala 1957

(40) SILIPRANDI, D. und N. SILIPRANDI: Biochem.biophysica Acta 14, 52 (1954)

(41) ROSSI-FANELLI, A., N. SILIPRANDI, D. SILIPRANDI und P. CICCARONE: Arch.Biochem.Biophys. 58, 237 (1955)

(42) WOLLEY, D.W. und R.B. MERRIFIELD: Feder.Proceedings 11, 458 (1952)

(43) STEYN-PARVE, E.P., J.C. KOEDAM und D.L. VAN RHEENEN: Biochim.biophysica Acta 19, 181 (1956)

(44) WESTENBRINK, H.G.K., D.A. VAN DORP, M. GRUBER und H. VELDMAN: Enzymologia 9, 73 (1940)

(45) OCHOA, S. und R.A. PETERS: Biochem.J. 32, 1501 (1938)

(46) WESTENBRINK, H.G.K. und D.A. VAN DORP: Enymologia 10, 212 (1941/42)

(47) LIPTON, M.A. und C.A. ELVEHJEM: Nature (Lond.) 145, 226 (1940)

(48) STEYN-PARVE, E.P.: Biochim. biophysica Acta 8, 310 (1958)

(49) LEUTHARDT, F. und H. NIELSEN: Helv. Chim. Acta 35, 1196 (1952)

(50) FORSANDER, O.: Soc. Sci. Fennica, Commentationes Phys.-Math. 19, 2 (1956)

(51) GREILING, H.: IV. Internationaler Kongreß für Biochemie, Wien 1958 Abstracts, S. 46

(52) KIESSLING, K.-H.: Nature (Lond.) 172, 1187 (1953)

(53) KIESSLING, K.-H.: Acta Chem. Scand. 10, 831 (1956)

(54) SMITS, G. und E. FLORIJN: Biochim. biophysica Acta 5, 217 (1950)

(55) ZUZUOKI-ZIRO: J. Biochem. (Jap.) 42, 27 (1955)

(56) SMITS, G. und E. FLORIJN: Biochim. biophysica Acta 5, 535 (1950)

(57) WESTENBRINK, H.G.K. und E.P. STEYN-PARVE: Biochim-biophysica Acta 1, 87 (1957)

(58) WESTENBRINK, H.G.K., D.A. VAN DORP und M. GRUBER: Rec. trav. chim. 60, 185 (1941)

(59) BRIN, M., S.S. SHOSHET und C.S. DAVIDSON: J. Biol. Chem. 230, 319 (1958)

(60) THILO, E. und E. GRUNZE: S.-B. Dtsch. Akad. Wiss. Berlin, math.-naturwiss. Kl. 1953 Nr. 5

(61) HEALD, P.J.: Biochem. J. 63, 235 (1956)

(62) HANES, C.S. und F.A. ISHERWOOD: Nature (Lond.) 164, 1107 (1949)

(63) ROSENTHAL, T.B.: J. Biol. Chem. 173, 25 (1948)

(64) VOGEL, H.: Chemie und Technik der Vitamine II, 1 Enke Verlag Stuttgart 1953

(65) GREILING, H. und L. KIESOW: Z. Naturforschg. 12b, 605 (1957)

(66) GREILING, H., W. WINKELMANN und E. SCHÜTTE: Acta biol. med. german. 1, 389 (1958)

(67) ALIVISATOS, S.G.A. und O.F. DENSTEDT: Science 114, 281 (1951)

(68) WINKELMANN, W.: unveröffentlichte Versuche

(69) JACONO, J.M., G. WOLF und B. CONNOR JOHNSON: Feder. Proceedings 12, 223 (1953)

(70) RHODEWALD, M. und M. WEBER: Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 306, 90 (1956)

(71) RHODEWALD, M. und M. WEBER: Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 311, 239 (1958)

(72) MACHO, L.: Nature (Lond.) 180, 1351 (1957)

(73) SCHILD, K. T. und W. MAURER: Biochem. Z. 323, 235 (1952)

(74) EGGLETON. G. P. und P. EGGLETON: Brit. J. Physiol. 68, 193 (1929)

(75) KERR, S. E. und L. DAOUD: J. Biol. Chem. 109, 301 (1935)

(76) HOFMANN-CREDNER, D.: Arch. int. Pharmacodyn. 103, 71 (1955) 104, 37 (1956)

(77) DAJANI, R. M. und J. M. ORTEN: J. biol. Chem. 231, 913 (1958)

(78) GREILING, H. und L. KIESOW: Z. Naturforschg. 11b, 491 (1956)

(79) M. VISCONTINI, G. BONETTI, C. EBNÖTHER und P. KARRER: Helv. chim. Acta 34, 1384 (1951)

Herrn Professor Dr.Dr. E. Schütte, sowie
Herrn Dr. H. Greiling danke ich für die
Unterstützung bei dieser Arbeit.

Lebenslauf

Am 24. August 1935 wurde ich als Sohn des Bundesbahnobersekretärs Friedrich Winkelmann und seiner Ehefrau Marie, geb. Grobbrügge geboren. Von 1941 bis 1946 besuchte ich in Kirchweyhe, dem Wohnort meiner Eltern, die Volksschule zu Lahausen. Ostern 1946 wurde ich in die Oberschule für Jungen an der Dechanatstraße in Bremen aufgenommen, an der ich im Frühjahr 1954 meine Reifeprüfung ablegte. Mit dem Sommersemester 1954 begann ich mein vorklinisches Studium der Medizin an der Freien Universität Berlin und bestand am 26.10.1956 die ärztliche Vorprüfung. Die klinischen Semester absolvierte ich ebenfalls an der Freien Universität Berlin, wo ich am 25.2.1960 vor dem zuständigen Ausschuß die ärztliche Prüfung ablegte. Gegenwärtig arbeite ich als Medizinalassistent im Physiologisch-chemischen Institut der Freien Universität Berlin.